

THESIS

MUNICH

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

GERINNUNGSPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG VON HEPARIN
UND HYALURONIDASE

Karin Marburger

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

GERINNUNGSPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG VON HEPARIN
UND HYALURONIDASE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karin Marburger
aus Essen

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv.-Doz.Dr.H.MATHIES

Korreferent: Prof.Dr.W.SEITZ

Dekan: Prof.Dr.R.ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 22.3.1966

INHALTSANGABE

Einleitung	5
Heparin	11
Hyaluronidase	14
<u>Eigene Untersuchungen</u>	18
<u>Vorversuch:</u>	
Gerinnungsphysiologische Untersuchungen über die Wechselbeziehungen zwischen Hyaluronidase und Blutgerinnungsfak- toren:	
1) mit Hilfe der Thromboplastinzeit	20
2) mit Hilfe der Rekalkifizierungszeit am thrombozytenhaltigen Mischplasma	25
3) mit Hilfe der Rekalkifizierungszeit am thrombozytenarmen Mischplasma	29
4) mit Hilfe der Thrombinzeit	33
<u>Hauptversuch:</u>	37
Gerinnungsphysiologische Untersuchungen über die Wechselbeziehungen zwischen He- parin und Hyaluronidase:	
I. mit Hilfe der Rekalkifizierungs- zeit	40
II. mit Hilfe der Thrombinzeit	44
III. Überprüfung der Rekalkifizierungs- zeit mit Hilfe des Thrombelastos- graphen	48
Literaturverzeichnis	60



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E I N L E I T U N G :

Seit den Untersuchungen von Blair und Mitarbeitern (5), Badin (3) und Johnston (17) wissen wir, daß bei Entzündungsvorgängen, auch allergischer Art, die Mucopolysaccharide der jeweils betroffenen Gewebe vermehrt fermentativ gespalten werden, während in ruhenden, d.h. nicht entzündlich alterierten Geweben ein gewisses Gleichgewicht zwischen dem Aufbau der Mucopolysaccharide und der fermentativen Spaltung dieser Stoffe besteht. Das Ferment, welches die Spaltung der Mucopolysaccharide im Wesentlichen herbeiführt, ist die sogenannte Hyaluronidase, (erstmalig dargestellt und beschrieben von Duran Reynals 1928).

Diese Aufspaltung der Mucopolysaccharide durch die Hyaluronidase darf, da sie bei Entzündungsvorgängen vermehrt auftritt, als Teilursache für das entzündliche Ödem angesehen werden.

Es besteht daher die berechtigte Annahme, daß Medikamente, welche entzündliche Gewebsschwellungen verhindern oder rückgängig machen, ihren Wirkungsmechanismus teilweise in einer Blockierung der Hyaluronidase haben.

Z.B. konnte Mayer (20) in seinen Untersuchungen zeigen, daß entzündliche Vorgänge durch eine physiologische Neutralisation der Hyaluronidase reduziert werden. Wie wir wissen, wirken die Antirheumatika (Salizylate, Chloräthylbenzmethoxazon, Glucocorticoide) ebenfalls hyaluronidasehemmend (36, 37).

Mathies und Mitarbeiter (21, 22, 23) konnten in ihren Arbeiten nachweisen, daß die hyaluronidasehemmenden Substanzen nur bei vorhandenen Nebennieren, also nicht bei adrenaletomierten Tieren, wirken. Weitere Versuche von Mathies (24) und Domenjoz (9) ergaben, daß die Nebennieren hypophysektomierter Tiere nach Injektion von Antihistaminika nicht den sonst üblichen von Sayers (35) beschriebenen Ascorbinsäuredeplexionseffekt aufweisen, obwohl die hyaluronidasehemmende Wirkung der zugeführten Substanzen erhalten bleibt.

Daraus schließt Mathies (25), daß die hyaluronidasehemmenden Stoffe nicht die Rinde, sondern das Mark der Nebenniere aktivieren, worauf es zu einer Ausschüttung von Katecholaminen kommt. Der Nachweis, daß Adrenalin wie auch Noradrenalin sowohl bei intakten als auch adrenaletomierten Ratten die Hyaluronidase hemmen, stützt diese Ansicht. (Mathies und Mitarbeiter (26). Die Autoren konnten außerdem nachweisen, daß nach Applikation von Antirheumatica ebenfalls Katecholamine ausgeschüttet werden (25), was die oben geäußerte These erhärtet.

Auffällig ist, daß die Inaktivierung der Hyaluronidase durch Adrenalin erst zu einem Zeitpunkt nachweisbar wird, zu dem die - z.B. an der Pupillenweite nachweisbare - primäre Katecholaminwirkung bereits wieder abgeklungen ist.

Mathies (27) konnte beispielsweise auch während einer zweistündigen Adrenalininfusion bei adrenaletomierten Tieren zunächst keine Hyaluronida-

sehemmung feststellen. Diese wird erst einige Zeit nach Absetzen der Adrenalinzufuhr nachweisbar.

Man nimmt daher an, daß erst beim Absinken des vorher erhöhten Katecholaminserumspiegels auf ein niedrigeres Niveau jener Prozeß einsetzt, der die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität auslöst.

Eine Beteiligung an diesem Reaktionsablauf ist für solche körpereigenen Stoffe zu diskutieren, deren hyaluronidasehemmende Wirkung in vivo bzw. in vitro bereits bekannt ist.

Einer dieser Stoffe ist nach van Caneghem, Marx und Spier (6) das Heparin, Schon Costa, Ferrari und Pellegrini (10) brachten unabhängig davon die Wirkung der Salizylate in vivo mit einer Hemmung der Hyaluronidase durch Heparin in Verbindung. Auch Autoren wie Winterstein und Perlick (30, 40) versuchten in mehrfachen Experimenten die These zu belegen, daß das Heparin durch Hyaluronidaseblockierung regulierend in den Abbauprozess der Mucopolysaccharide eingreift, und zwar sowohl bei physiologischen als auch medikamentös ausgelösten Vorgängen.

Nach Gibian (13) ist das Heparin kein direktes Substrat der Hyaluronidase, es soll aber auf Grund seiner auffallenden chemisch-strukturellen Ähnlichkeit mit der Hyaluronsäure bei biochemischen Vorgängen teilweise an die Stelle der Hyaluronsäure treten und auf diese Weise die Hyaluronidase blockieren. Als erster wies Mc. Clean (7) darauf hin, daß die bis dahin bekannten Hemmsubstanzen durch ihre strukturel-

le Verwandtschaft zur Hyaluronsäure wirken sollen.

Auch Pantschliko und Kaiser (28) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß Magenmucin und Heparin die fermentative Tätigkeit der Hyaluronidase negativ beeinflussen.

Bei ihren Experimenten in vitro kamen jedoch Autoren wie Rogers (34) und Swyer (36) sowie Hadidian und Pirie (15) hinsichtlich der zur Hemmung notwendigen Konzentration der reagierenden Substanzen zu recht unterschiedlichen Ergebnissen. Ein Grund hierfür mag die Anwendung verschiedener Puffersysteme und Ionenkonzentrationen gewesen sein.

Nach Houck (16) konkurrieren bei der Hyaluronidasehemmung der Inhibitor und das Substrat um die gleichen enzymatischen Ansatzpunkte. Das Heparin soll dabei eine lockere niedrigenergetische Verbindung mit dem Enzym (Hyaluronidase) eingehen, denn der Verfasser wies nach, daß allein ein Anstieg der Ionenkonzentration ausreicht, die subtile Enzymbindung zu sprengen. Ähnliche Versuchsergebnisse veröffentlichten auch Alburn und Whitley (1).

Glick, Edmondson und Ottosen (14) entdeckten 1958, daß durch Fraktionen von Rattenmastzellen, die sie durch Peritonealwaschungen erhielten, die Wirkung der Hyaluronidase gehemmt wurde. Nach Erhitzung der Fraktionen ging dieser Effekt nicht verloren, sondern wurde sogar deutlich gesteigert. Die Autoren führen diese Wirkung auf den Heparin Gehalt der Mastzellen zurück, denn das Heparin ist in seiner

Substanz und Wirkung als äußerst hitzestabil bekannt.

Aber auch gegenteilige Meinungen wurden veröffentlicht. So bezweifelt z.B. Juhlin (18) eine Wirkung des Heparins auf die Hyaluronidase, da nach seinen Versuchen die Aktivität von Hodenhyaluronidase nach subcutaner Injektion von Heparin und Cortison sogar ansteigt. Als Indikator benutzte der Verfasser bei seinen Versuchen Hämoglobin, der Verfasser vermutet, daß das Heparin die Hyaluronsäure nach deren Abbau durch die Hyaluronidase ersetzen kann.

Auch Ramoino und Minola (32) stellten bei Versuchen in vitro keinerlei Veränderungen der Heparinwirkung im Blut nach Zugabe von Hyaluronidase fest. Die letztgenannten Autoren prüften die Heparinwirkung im Blut mit Hilfe der Thrombinzeit.

Die hier behandelten enzymatischen Vorgänge wurden zum Teil mit sehr empfindlichen biologischen Testmethoden untersucht; letztlich ist die gegenseitige Beeinflussung der beiden Stoffe Heparin und Hyaluronidase und vor allem der genaue Reaktionsablauf noch ungeklärt. Auch bisher im einzelnen nicht bekannte Nebenreaktionen dürften eine größere Rolle spielen. Gibian (13) arbeitete z.B. auch mit großem Überschuß an hochgereinigten Fermentpräparaten und konnte gerade in diesen Versuchen eine Wirkung des Heparins auf die Hyaluronidaseaktivität nicht feststellen.

Die meisten der in der Literatur angegebenen Versuche wurden entweder mit der auf dem Spreading-Effekt beruhenden Farbstoff-Quaddelmethode ausgeführt, oder man wendete viscosimetrische oder turbidimetrische Methoden an.

Andererseits kommen sowohl Hyaluronidase als auch Heparin physiologischerweise im Serum vor. Es liegt daher der Schluß nahe, daß sich beide Substanzen auch bei den mannigfaltigen Reaktionen der Blutgerinnung gegenseitig beeinflussen, und daß man eventuell diesen Einfluß der beiden Stoffe aufeinander mit gerinnungsphysiologischen Methoden nachweisen könnte.

Diese Frage schien uns daher einer genaueren Untersuchung wert. Zuvor jedoch sollen die beiden Substanzen und die bisher über sie bekannten Eigenschaften und Daten noch einmal kurz beleuchtet werden.

DAS HEPARIN:

Das Heparin ist ein Mucopolysaccharid-Polyschwefelsäureester mit einem Molekulargewicht von etwa 1600 bis 1700 (13). Ungebundenes Heparin ist infolge seines hohen Schwefelsäuregehaltes eine relativ starke Säure. Als Natriumsalz ist es in Wasser leicht löslich, und da es weitgehend thermostabil ist, kann es gut sterilisiert werden.

Heparin ist mit Alkohol, Aceton und BaCl_2 im sauren Milieu fällbar. Aber auch stark alkalische Protamine und Histone, sowie basische Farbstoffe (Toloidinblau) und Eiweißkörper wirken hemmend auf das Heparin.

Als die Bildungsstätte des Heparins im Organismus werden heute die Mastzellen angesehen, zumindest wird es dort in größeren Mengen gespeichert und läßt sich dort nicht im Nativzustand, sondern an einen Lipoproteinkomplex gebunden nachweisen. Der Lipoproteinkomplex besteht aus Polipeptiden, welche aus Cystein, Thyrosin, Threonin und Leucin zusammengesetzt sind.

Das reine, proteinfreie Heparin wird vom Organismus gut vertragen, oral verabreicht ist es jedoch nicht wirksam, da es im Magendarmtrakt abgebaut und zerstört wird. Bei parenteraler Verabreichung des Stoffes setzt seine Wirkung sofort ein und hält etwa 4 bis 6 Stunden an.

Das Heparin hat bekanntlich seine hauptsächlichen Funktionen im Bereich des Blutgerinnungssystems, und zwar ist es der physiologische

Hemmkörper sowohl der ersten als auch der zweiten Gerinnungsphase. (s. Gerinnungsschema weiter unten.)

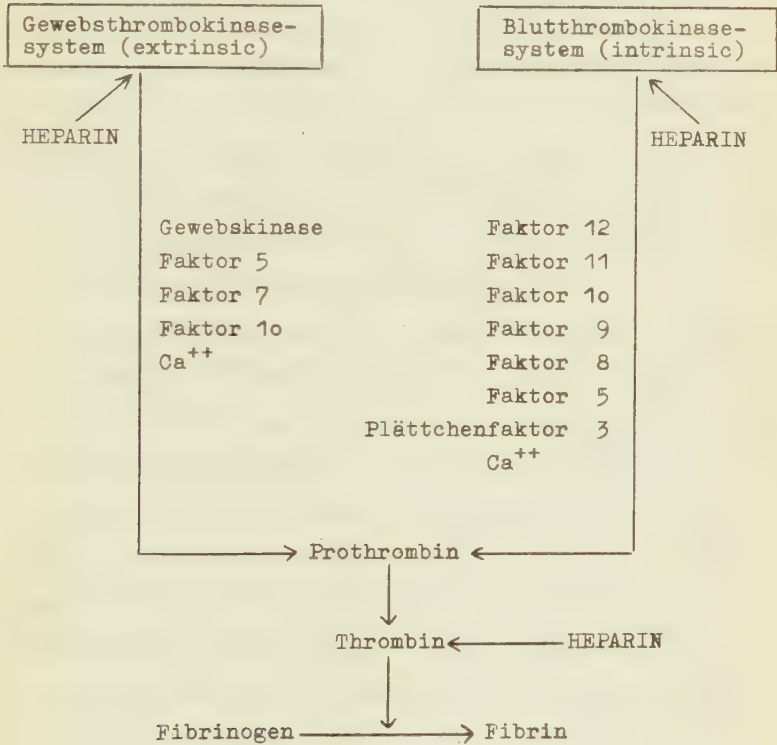
Zunächst geht es mit dem Thrombin eine direkte Verbindung ein, wobei die elektrostatischen Eigenschaften des Thrombins verändert werden. Die Bindung hat eine Inaktivierung des Thrombins zur Folge. Heparin wirkt außerdem als Antiprotrombin, hemmt die Thrombokinase und steigert die Fibrinolyse. Für seine gerinnungshemmende Wirkung braucht das Heparin jedoch die Anwesenheit zweier Plasmafaktoren (1 und 2) und gewinnt erst nach einer Bindung mit diesen Substanzen seine antikoagulatorische Eigenschaft.

Heparin kommt normalerweise im Plasma überhaupt nicht oder nur in überaus minimaler Menge vor, aus Normalblut konnte es ebenfalls nur in sehr geringer Menge isoliert werden. (Koller und Fritschy 19). Die Toxizität des Heparins ist sehr gering, jedenfalls führt es zu keinen Veränderungen an der Gefäßintima. (Sämtliche hier aufgeführten Daten wurden dem umfassenden Werk von Gibian: " Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen " entnommen.)

Zur kurzen Information sei noch eine kleine Skizze des Gerinnungsschemas zugefügt.

EINFACHES GERINNUNGSSCHEMA

(entnommen aus den "Gerinnungsbestimmungen" der Firma "Roche").



DIE HYALURONIDASE:

Die Hyaluronidase ist ein spezifisches Ferment der Hyaluronsäure. Durch Depolarisation der Hyaluronsäure, dem Hauptbaustein der Mucopolysaccharide, löst sie die Interzellulärsubstanz, den "Zellkitt" auf, beispielsweise die Corona radiata der Eizelle.

Die Hyaluronidase ist nicht artspezifisch, sie ist identisch mit dem sogenannten " Spreadingfaktor ", der heute bei percutan und intracutan applizierten Medikamenten häufig Anwendung findet.

Hodengewebe und Samenflüssigkeit sind reich an diesem Ferment, welches leicht und vollständig in Wasser löslich ist. Stellt man Hyaluronidase rein dar, so sinkt ihre Stabilität mit abnehmender Konzentration der Lösungen. Dieser Effekt kann jedoch durch Zugabe von Salzen und vor allem von Proteinen und Peptiden kompensiert werden. Das pH-Optimum der Hyaluronidase ist abhängig von der Art des Lösungsmittels, in physiologischer Kochsalzlösung liegt zum Beispiel das pH-Optimum der Testeshyaluronidase bei pH 6 bis 6,5. Das Temperaturoptimum scheint bei ca 50 ° Cel. zu liegen. (Sämtliche hier aufgeführten Daten wurden dem umfassenden Werk von Gibian: " Mucopolysaccharide und mucopolysaccharidasen " entnommen.)

In der Literatur wurde mehrfach darauf hingewiesen, daß die Hyaluronidase die Blutgerinnungsfaktoren teilweise angreift und hemmt. Baserga und Mitarbeiter (2) berichten, daß die Hyase den Prothrombinverbrauch im Serum beeinflusse. Quattrin (31)

beobachtete eine Hemmung der Blutplättchenagglutination durch das Ferment bei relativ niedriger Konzentration der Hyaluronidase. Morphologische und strukturelle Veränderungen der Thrombozyten begleiten dieses Phänomen.

1952 stellten Pellegrini und Russo (29) fest, daß die Prothrombin- und Rekalkifizierungszeiten nach Zugabe von Hyaluronidase verlängert werden und zwar abhängig von der Menge des beigegefügt Enzyms.

Fiala, Meranze und Roth (11) wiesen ebenfalls auf eine Beeinflussung der Blutgerinnung durch die Hyaluronidase hin. Bei Versuchen mit dem ersten Stadium der Blutgerinnung, der Aktivierung von Prothrombin, stellten sie fest, daß das thromboplastische Material des Plasmas durch dialysierte Stierhyaluronidase angegriffen und in seiner Wirkung beeinträchtigt wird. Bei diesen Versuchen konnte jedoch keine Verlängerung der Thrombinzeit nachgewiesen werden; die Autoren schließen daraus, daß der Ansatzpunkt des Fermentes nicht beim Prothrombin und auch nicht beim Fibrinogen liegt. Die Verfasser ließen außerdem Gewebsthromboplastin mit dem Enzym reagieren und konnten auch hierbei den oben beschriebenen Effekt bestätigen. Worauf im einzelnen die Hemmwirkung der Hyaluronidase auf die Gerinnungsfaktoren beruht, ist bisher noch weitgehend unbekannt.

Djerassi, Klein und Faber (8) untersuchten ebenfalls die gegenseitige Beeinflussung von Hyaluronidase und Thromboplastin. Sie konnten nachwei-

sen, daß bovine Testicular-Hyaluronidase das Thromboplastin in Abwesenheit der Blutplättchen inaktiviert. Fügten sie jedoch Thrombozyten hinzu, so fiel dieser Hemmungseffekt aus. (Thromboplastin-Generationstest von Biggs und Douglas.)

Werle und Turtur (39) kamen in ihren Arbeiten zu ähnlichen Ergebnissen, sie ließen aber die Möglichkeit offen, daß der Inaktivierungseffekt nicht durch die Hyaluronidase selbst, sondern durch die Anwesenheit verunreinigender Zwischenprodukte erfolgt. Nach Gaspari (12) bewirkt die Hyaluronidase eine Verzögerung der Koagulation in vitro und in vivo. Nach Injektion des Enzyms in Blutkoagula erfolgte jedoch keine Lysis. Der Autor zeigte außerdem, daß sich nach perkutaner Injektion von Hyaluronidase die Prothrombinzeit und die Koagulationszeit verlängerten. (Verlängerung der nach Quick bestimmten Prothrombinzeit um 5 bis 10 Minuten).

Nach den vorliegenden Literaturangaben, die wegen ihrer Vielzahl hier natürlich nicht vollständig aufgeführt werden, mag die Hemmwirkung der Hyaluronidase auf das Thromboplastin schon als absolut erwiesene Tatsache erscheinen. Die vorher erwähnten Autoren arbeiteten jedoch zum Teil mit sehr unterschiedlichen Versuchsbedingungen, welche die erzielten Ergebnisse schwer miteinander vergleichen und abwägen lassen.

Da wir in unseren später dargelegten Versuchen über die Wechselbeziehung von Hyaluronidase und Heparin gerinnungsphysiologische Untersuchungsmethoden anwandten, und um außerdem möglichst exakte und verwertbare Vergleichsmöglichkeiten zu erlangen, prüften wir in einem Vorversuch noch einmal die Wirkung der Hyase auf das Thromboplastin und auf das Thrombin.

Im Vorversuch und im Hauptversuch wurden deshalb die gleichen Reagentien verwendet und gleiche Versuchsbedingungen geschaffen.

Eigene Untersuchungen.

Vorversuch:

Zur nochmaligen genauen Überprüfung der Beeinflussung von Thromboplastin und Thrombin durch die Hyaluronidase wurden im einzelnen die Thromboplastinzeit (Vorversuch 1), die Rekalzifizierungszeit (Vorversuch 2 und 3) sowie die Thromboplastinzeit (Vorversuch 4) bestimmt und zwar:

- a) in einem Leerversuch mit normalem Plasma gesunder Personen und
- b) nach Zugabe von Hyaluronidase in den Konzentrationen 300 IE/ml,
150 IE/ml,
75 IE/ml.

Versuchsbedingungen:

Alle Versuche wurden unter gleichen und möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt.

Zur Herstellung eines plasmagleichen Milieus verwendeten wir eine Pufferlösung mit dem optimalen pH-Wert von 7,3. Es handelt sich dabei um ein Gemisch von einer Diäthylbarbitursaurelösung mit dem pH-Wert 6,7 und einer Diäthylbarbitursaurelösung von pH 7,6 im Verhältnis von 1:1. Beide Pufferlösungen wurden in Ampullen zu 20 ml von der Firma Behring bezogen. Sämtliche Experimente wurden in einem thermostatisch regulierten Wasserbad bei einer Temperatur von 37° Cel. durchgeführt. Die einzelnen Substanzen wurden vorher auf die erforderliche Temperatur gebracht.

Reagentien:

- a) Mischplasma von 6 bis 8 gesunden Personen, welches wir folgendermaßen gewannen: das Blut wurde mit einer 3,8%-igen Natriumcitratlösung in einer Verdünnung von 1:10, dann sorgfältig abpipettiert und im Kühlschrank bei 8 ° Cel. aufbewahrt. Dieses thrombozytenhaltige Mischplasma wurde später zur Gewinnung thrombozytenarmen Mischplasmas weitere 30 Minuten bei 6000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.
- b) Eine Pufferlösung mit dem pH-Wert 7,3, bestehend aus dem oben erwähnten Gemisch zweier Diäthylbarbitursäurelösungen mit den pH-Werten 6,7 und 7,6 im Verhältnis 1:1.
- c) Das Thromboplastinpräparat "Roche" in verschiedenen Konzentrationen: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, die wir durch Herstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe der Stammlösung erhielten.

Das verwendete Thromboplastinpräparat stellt nach Angaben der Firma "Roche" eine aus tierischen Organen gewonnene Flüssigkeit dar, die den Wirkstoff Thrombokinase in stabilisierter, gebrauchsfertiger Form enthält. Das Mischungsverhältnis von normalem menschlichen Zitratplasma zur Chlorcalciumlösung mol/40 und zur Thromboplastinlösung soll nach Angaben der Firma 1 : 1 : 1 betragen. (Entnommen aus der Präparateliteratur der Firma "Roche".)

- d) Thrombinlösung in verschiedenen Konzentrationen, die wir ebenfalls durch Herstellung einer geome-

trischen Verdunnungsreihe mit der Stammlösung unter Zugabe einer Pufferlösung mit pH 7,3 (s. oben) erhielten. Die einzelnen Konzentrationen enthalten

folgende Mengen Thrombin:	1/1 Lösung	= 60	IE/ml
	1/2 "	= 30	IE/ml
	1/4 "	= 15	IE/ml
	1/8 "	= 7,5	IE/ml
	1/16"	= 3,75	IE/ml.

e) Das Hyaluronidasepräparat "Kinetin" von der Firma Schering, in den Konzentrationen: 300 IE/ml, 150 IE/ml und 75 IE/ml.

f) Calciumchlorid mol/40.

Vorversuch 1:

Wie vorher ausgeführt, verdeutlicht sich die Hemmung des Thromboplastins durch die Hyaluronidase in einer Verlängerung der Thromboplastinzeit. Um auch eine geringgradige Hemmwirkung sichtbar zu machen, stellten wir eine geometrische Verdunnungsreihe der Thromboplastinstammlösung her: 1:1, 1:2, 1:4 1:128.

Der Vorversuch 1 gliedert sich in zwei Versuchsanordnungen (a und b), wobei in Anordnung a, im sogenannten Leerversuch, dem Thromboplastin Puffer zugegeben wurde, in Anordnung b jedoch Hyaluronidase und zwar in den drei verschiedenen Konzentrationen: 300 IE, 150 IE, 75 IE/ml, um über die Reaktion zwischen Hyase und Thrombokinas gleichzeitig quantitative Aussagen machen zu können. Jede Anordnung besteht aus 8 Versuchsreihen mit jeweils verschiedener Thromboplastinkonzentration. Mit jeder der acht Throm-

boplastinkonzentrationen wurden zur Erlangung einer gewissen statistischen Sicherheit 20 Einzelversuche durchgeführt.

Im Einzelexperiment wärmten wir 0,1 ml Mischplasma eine Minute lang im Wasserbad bei 37°Cel. vor. In Versuchsanordnung a gaben wir dann 0,1 ml Pufferlösung von pH 7,3 hinzu und 0,1 ml Thromboplastin in den oben angegebenen Konzentrationen.

Zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick messen wir die Plasmagerinnungszeit nach Zugabe einer optimalen Menge von Calciumionen und optimaler Thromboplastinkonzentration bei einer konstanten Temperatur von 37°Cel.

Nach Zugabe der ersten Tropfen Chlorcalciumlösung wird die Zeit bis zur "En-bloc-Gerinnung" mit der Stoppuhr gemessen. Der Gerinnungseintritt wird durch stetiges Umrühren mit einer Drahtöse bis zur Gerinnselbildung ermittelt.

In Versuchsanordnung b wurde statt der Pufferlösung den übrigen noch angegebenen Reagentien 0,1 ml Hyaluronidase in den Konzentrationen 300, 150 und 75 IE/ml zugefügt.

Alle Versuche wurden grundsätzlich nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten durchgeführt.

Die einzelnen Versuchsanordnungen sind im Ansatz zu Vorversuch 1 noch einmal schematisch dargestellt.

Ansatz zu Vorversuch 1.

Versuchsanordnung a (Leerversuch)

Je Einzelversuch wurden verwendet:

- 0,1 ml auf 37° vorgewärmtes Mischplasma
 - + 0,1 ml Thromboplastin in den Konzentrationen
von 1:1 bis 1:128 der Stammlösung.
 - + 0,1 ml Pufferlösung von pH 7,3
 - + 0,1 ml CaCl_2 mol/40
-

Versuchsanordnung b (Zugabe von Hyaluronidase)

- 0,1 ml auf 37° vorgewärmtes Plasma
- + 0,1 ml Thromboplastin in den Konzentrationen
von 1:1 bis 1:128 der Stammlösung.
- + 0,1 ml Hyaluronidaselösung in den Konzentra-
tionen von 75 IE/ml,
150 IE/ml,
300 IE/ml.
- + 0,1 ml CaCl_2 mol/40.

Tabelle 1

Thromboplastin- konzentrationen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
a) Leerversuch	15,9	15,2	17,2	20,6	24,8	31,1	37,6	47,4
b) Zugabe von Hyaluronidase								
75 IE/ml	15,9	14,8	18,1	21,4	26,0	32,3	38,4	49,6
150 IE/ml	15,0	15,0	17,8	21,3	27,8	34,7	44,1	58,6
300 IE/ml	14,7	15,2	18,1	22,4	29,5	37,8	49,9	70,8

Die in Tabelle 1 angegebenen Zeiten stellen
die Thromboplastinzeit in Sekunden dar und
sind Mittelwerte aus 20 Einzelbestimmungen.

Ergebnisse von Vorversuch 1:

Inkubieren wir Hyaluronidase zu verschiedenen Thromboplastinverdünnungen (1:1 bis 1:128), so zeigt sich eine Verzögerung des Gerinnungseintrittes vor allem bei den Thromboplastinkonzentrationen 1:16 bis 1:128. Wie weiterhin aus der Tabelle der Versuchsergebnisse (Tabelle 1) zu ersehen ist, tritt die thromboplastin-hemmende Aktivität der Hyaluronidase um so mehr in Augenschein, je größer der Verdünnungsgrad der Thromboplastinstammlösung ist. Die Hemmung wird bei der Konzentration von 1:128 der Stammlösung am deutlichsten. Versuche mit noch größeren Verdünnungen waren jedoch unergiebig, da in diesem Fall eine Gerinnung aus Mangel an Thrombokinasen überhaupt nicht mehr erfolgen würde.

Wir sehen außerdem, daß das Ausmaß der Hemmung abhängig von der Menge (= Konzentration) der zugefügten Hyaluronidase ist. Je größer die Hyaluronidasekonzentration ist, um so deutlicher zeigt sich auch die Gerinnungsverzögerung. (S. auch Kurve Nr. 1)

Vorversuch 2:

Überprüfung der gegenseitigen Beeinflussung von Blut-thromboplastin und Hyaluronidase mittels Bestimmung der Rekalzifizierungszeit am thrombozytenhaltigen Mischplasma. (Plasma mit normalem Thrombozytengehalt).

Auch hier wurde zunächst ein Leerver-such (Versuchsanordnung a) und dann ein Versuch mit Zugabe verschiedener Hyaluronidasekonzentrationen (300, 150, 75 IE/ml) durchgeführt (Versuchsanordnung b).

Die Bestimmung der Rekalzifizierungs-zeit führen wir nach Howell durch. Hierbei werden die durch das Natrium citricum gebundenen Calciumchlorid-ionen des Venenblutes durch erneute Zugabe von CaCl_2 -ionen ersetzt.

Die Zeit von der Inkubation des Cal-ciumchlorids bis zur Gerinnselbildung wird unter stetem Rühren mit der Drahtöse mittels einer Stopp-uhr festgestellt.

Im Leerverversuch (Versuchsanordnung a) fügten wir zu 0,2 ml thrombozytenhaltigem Mischplasma 0,2 ml einer Pufferlösung von pH 7,3, und dann 0,2 ml einer mol/40 Calciumchloridlösung zu.

Alle Reagentien wurden vorher auf 37° C. erwärmt, der ganze Versuch wurde bei derselben Temperatur im Wasserbad durchgeführt.

Bei Versuchsanordnung b wurde unter gleichen Versuchsbedingungen gearbeitet, lediglich die 0,2 ml der Pufferlösung wurden durch die gleiche Menge Hyaluronidase ersetzt, wobei wiederum mit den dreiverschiedenen Hyaluronidasekonzentrationen gearbeitet wurde.

Um eine größere statistische Sicherheit zu erhalten, führten wir die Untersuchungen an fünf verschiedenen Tagen durch,

Die Versuchsanordnungen sind im folgenden noch einmal schematisch dargestellt.

Ansatz zu Vorversuch 2:

Versuchsanordnung a (Leerversuch)

Je Einzelversuch wurden verwendet:

- 0,2 ml thrombozytenhaltiges Mischplasma
 - + 0,2 ml Pufferlösung von pH 7,3
 - + 0,2 ml CaCl_2 mol/40
-

Versuchsanordnung b (Zugabe von Hyaluronidase)

- 0,2 ml thrombozytenhaltiges Mischplasma
- + 0,2 ml Hyaluronidase in den Konzentrationen
 - 300 IE/ml
 - 150 IE/ml
 - und 75 IE/ml
- + 0,2 ml CaCl_2 mol/40.

Die Inkubationszeit der Substanzen betrug 10 Minuten. Die bei den einzelnen Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt, wobei in der oberen Reihe die fünf Versuchstage angegeben sind.

Tabelle 2

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
a) LEERVERSUCH-ZUGABE VON PUFFER	90,4	86,1	92,2	102,7	98,8
b) ZUGABE VON HYALURONIDASE					
75 IE/ml	85,8	90,0	93,0	110,5	108,8
150 IE/ml	78,2	95,3	90,5	116,1	108,0
300 IE/ml	87,0	89,0	87,0	111,1	104,0

Die in Tabelle 2 angegebenen Zahlen stellen die Rekalzifizierungszeit in Sekunden dar und sind die aus 4 Einzelbestimmungen erhaltenen Mittelwerte.

Ergebnis von Vorversuch 2:

Vergleichen wir die in Tabelle 2 angegebenen Werte des Leerversuches mit denen nach Hyaluronidasegabe erhaltenen, so sehen wir nur eine Differenz der Rekalzifizierungszeiten, die innerhalb der normalen Fehlergrenze liegt. Im Vorversuch 1 konnten wir zeigen, daß der hemmende Einfluß der Hyaluronidase auf das Gewebsthromboplastin erst in höheren Thromboplastinverdünnungen zur Geltung kam. Wir vermuten daher, daß im thrombozytenhaltigen Mischplasma die Blutthrombokinasen derart im Überschuß vorhanden ist, daß eine Hemmwirkung auch der hohen Hyaluronidasekonzentrationen nicht sichtbar wird. Im folgenden führten wir daher denselben Versuch noch einmal mit thrombozytenarmen Mischplasma durch, welches wir durch zusätzliches Zentrifugieren des normalen thrombozytenhaltigen Mischplasmas von 30 Minuten bei 6000 U/Min. erhielten.

Der Thrombozytengehalt des normalen Mischplasmas betrug etwa 800 000/ml, der des hochzentrifugierten Mischplasmas etwa 1-4/ml.

Vorversuch 3:

Überprüfung der gegenseitigen Beeinflussung von Blut-thromboplastin und Hyaluronidase mittels Bestimmung der Rekalzifizierungszeit am thrombozytenarmen Mischplasma.

Im Leerversuch (Versuchsanordnung a) fügten wir zu 0,2 ml thrombozytenarmem Mischplasma 0,2 ml einer Pufferlösung von pH 7,3 und dann 0,2 ml einer mol/40 CaCl_2 -Lösung hinzu. Es wurde unter den selben physikalischen Bedingungen gearbeitet wie in dem vorangehenden Versuch.

In Versuchsanordnung b wurden lediglich die 0,2 ml der Pufferlösung durch die gleiche Menge Hyaluronidase ersetzt, wobei wiederum die drei verschiedenen Hyaluronidasekonzentrationen verwendet wurden. Auch bei diesem Experiment führten wir die Untersuchungen an fünf verschiedenen Tagen durch. Die Versuchsanordnungen sind im folgenden schematisch dargestellt.

Ansatz zu Vorversuch 3:

Versuchsanordnung a (Leerversuch)

Je Einzelversuch wurden verwendet:

- 0,2 ml thrombozytenarmes Mischplasma
 - + 0,2 ml Pufferlösung von pH 7,3
 - + 0,2 ml CaCl_2 mol/40
-

Versuchsanordnung b (Zugabe von Hyaluronidase)

- 0,2 ml thrombozytenarmes Mischplasma
- + 0,2 ml Hyaluronidase in den Konzentrationen
 - 300 IE/ml
 - 150 IE/ml
 - und 75 IE/ml.
- + 0,2 ml CaCl_2 mol/40

Die Inkubationszeit der Substanzen betrug 10 Minuten. Die bei den einzelnen Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt, wobei in der oberen Reihe die fünf Versuchstage angegeben sind.

Tabelle 3

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
a) LEERVERSUCH=ZUGABE VON PUFFER	160,2	143,3	110,5	156,0	159,0
b) ZUGABE VON HYALURONIDASE					
75 IE/ml	172,2	156,7	117,7	164,5	168,5
150 IE/ml	188,7	187,5	130,9	182,5	190,2
300 IE/ml	219,5	224,5	146,2	202,5	203,5

Die in Tabelle 3 angegebenen Zeiten sind Mittelwerte aus 4 Einzelbestimmungen und stellen die Rekalkifizierungszeit in Sekunden bei thrombozytenarmem Mischplasma dar.

Ergebnis des Vorversuches 3:

Thrombozytenarmem Wischplasma zugefügt, bewirkt die Hyaluronidase eine Hemmung des Gerinnungseintrittes, die in ihrem Ausmaß von der Konzentration des Fermentes abhängig ist. Aus Tabelle 3 ist deutlich zu erkennen, daß der Grad der Gerinnungshemmung der Anzahl der Hyaluronidaseeinheiten im ml proportional ist. 300 IE/ml verlängern die Rekalzifizierungszeit um etwa 30 Sekunden, 150 Hyaluronidaseeinheiten um etwa 20 Sekunden, 75 IE/ml um etwa 10 Sekunden.

Vorversuch 4:

Überprüfung der gegenseitigen Beeinflussung von Thrombin und Hyaluronidase mit Hilfe der Thrombinzeit.

a) in einem Leerversuch

b) nach Zugabe von Hyaluronidase in den Konzentrationen 300, 150 und 75 IE/ml.

Wir benutzten in diesem Versuch dieselben Reagentien wie in den vorangehenden Experimenten, und arbeiteten im Wasserbad bei einer Temperatur von 37° Cel. Um die Hemmwirkung der Hyaluronidase gegenüber verschiedenen Thrombinkonzentrationen sichtbar zu machen, stellten wir eine geometrische Verdünnungsreihe der üblichen Thrombinstammlösung her, wobei die

1/1 Lösung = 60 IE

1/2 " = 30 IE

1/4 " = 15 IE

1/8 " = 7,5 IE

und die 1/16 " = 3,75 IE enthält.

Als Thrombinzeit bezeichnet man die Zeit vom Beginn der Thrombinzugabe zum Mischplasma bis zur Gerinnungsbildung.

Im Leerversuch (= Anordnung a) wurde zu 0,2 ml normalem Mischplasma 0,1 ml Thrombinlösung in den oben angeführten Konzentrationen und 0,1 ml Pufferlösung von pH 7,3 zugefügt.

In Anordnung b ersetzten wir die Pufferlösung durch 0,1 ml Hyaluronidase in den Konzentrationen 300, 150 und 75 IE/ml.

Die Versuchsanordnungen sind folgend noch einmal schematisch dargestellt.

Ansatz zu Vorversuch 4:

Versuchsanordnung a (Leerversuch)

Es wurden je Einzelversuch verwendet:

- o,2 ml thrombozytenhaltiges Mischplasma
 - + o,1 ml Thrombinlösung in den Konzentrationen
1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16
 - + o,1 ml Pufferlösung von pH 7,3
-

Versuchsanordnung b (Zugabe von Hyaluronidase)

- o,2 ml thrombozytenhaltiges Mischplasma
- + o,1 ml Thrombinlösung in den Konzentrationen
1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16
- + o,1 ml Hyaluronidase in den Konzentrationen
300, 150 und 75 IE/ml.

Die bei den einzelnen Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4

Thrombinkonzentrationen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
a) LEERVERSUCH = ZUGABE VON PUFFER	6	12,1	21,7	46,8	95,2
b) ZUGABE VON HYALURONIDASE					
75 IE/ml	6	11,5	20,3	46,2	106,4
150 IE/ml	6	11,8	20,8	42,7	92,1
300 IE/ml	6	11,2	19,3	41,8	98,6

Die in Tabelle 4 angegebenen Werte stellen die Thrombinzeit in Sekunden dar und sind Mittelwerte aus 12 Einzelbestimmungen.

Ergebnis des Vorversuches 4:

Wie aus Tabelle 4 zu entnehmen ist, zeigt die Hyaluronidase in keiner der angewendeten Konzentrationen einen hemmenden Einfluß auf das Thrombin. Es bestehen nur geringe Abweichungen zwischen den einzelnen Thrombinzeiten, die innerhalb der üblichen Fehlerbreite liegen. Bei höheren Thrombinverdünnungen scheint der Zusatz von Hyaluronidase eher stabilisierend auf das Thrombin zu wirken.

Zusammenfassend zu den Ergebnissen der Vorversuche können wir feststellen, daß die Hyaluronidase lediglich bei größeren Verdünnungen des Thromboplastinpräparates "Roche" und bei unphysiologischen Verdünnungen von Thrombozytenthrombokinasen (Verwendung von thrombozytenarmem Mischplasma) eine Gerinnungsverzögerung bewirkt.

Im ganzen können wir also die Ergebnisse der vorher erwähnten Autoren bestätigen.

Hauptversuch.

Wir bemühen uns in diesem Versuch festzustellen, ob und gegebenenfalls in welchem Maße sich die beiden Enzyme untereinander beeinflussen, und ob dieser hypothetische Blockierungseffekt eventuell auch bei gerinnungsphysiologischen Vorgängen, also im Plasma nachzuweisen ist.

Wie wir wissen und vorher ausgeführt haben, greift das Heparin hemmend in den Gerinnungsvorgang ein. Der normale Gerinnungsablauf wird also durch Heparin abhängig, von dessen Konzentration verzögert.

Diese Verzögerung läßt sich (s. Kapitel Heparin S. 11) u.a. durch die Bestimmung der Thrombinzeit und Rekalzifizierungszeit objektivieren, und ergibt bei gleichen Bedingungen und Mengenverhältnissen jedesmal denselben Wert.

Wird nun, wie von manchen Autoren vermutet wird (6, 29, 40), das Heparin im interzellulären Milieu an die Hyaluronidase gebunden, wobei es die Hyaluronidase inaktiviert, so wäre dieser Vorgang theoretisch auch im Plasma denkbar. Hierbei könnte dann aber umgekehrt durch die Bindung der beiden Stoffe aneinander das aktive, "freie" Heparin in seiner Konzentration verringert werden. Diese quantitative Verringerung des aktiven Heparins würde sich dann in einer meßbaren quantitativen Einschränkung seiner gerinnungshemmenden Eigenschaften nachweisen lassen. Um diese These zu überprüfen, bestimmten wir unter den jeweils gleichen und möglichst physiologisch gewählten Bedingungen (in vitro) die Thrombinzeit (Versuch I) und die Rekalzifizierungszeit (Versuch II).

- 1) in einem Leerversuch mit normalem Mischplasma gesunder Personen,
- 2) nach Zugabe eklatant wirkender Mengen von Heparin,
- 3) nach Zuführung derselben Mengen von Heparin bei gleichzeitiger Inkubation von Hyaluronidase im Überschuß.

Schließlich führten wir als Versuch III thrombelastographische Untersuchungen durch.

Versuchsanordnung.

Wie schon einmal erwähnt, bemühten wir uns, unsere Versuchsbedingungen möglichst physiologisch zu gestalten. Dabei wählten wir zur Herstellung eines plasmagleichen Milieus eine Pufferlösung, mit dem pH-Wert 7,3, bestehend aus einem Gemisch zweier Diäthylbarbitursäurelösungen mit den pH-Werten 6,7 und 7,6 im Verhältnis 1:1. Außerdem wurden sämtliche Versuche bei der optimalen Temperatur von 37°C. durchgeführt. Die einzelnen Reagentien wurden hierzu vorher auf die erwünschte Temperatur gebracht, jeder Test wurde dann in einem thermostatisch regulierten Wasserbad (37°) ausgeführt.

Als Reagentien wurden verwendet:

- a) Mischplasma von 6 - 8 gesunden Personen
- b) eine Pufferlösung von pH 7,3 (s.o.)
- c) Thrombinlösung in verschiedenen Konzentrationen (1:1, 1:2, 1:4, 1:8), stärkere Verdünnungen als 1:8 führten bei Heparinzusatz zu einer so starken Verzögerung des Gerinnungsvorganges, daß exakte Ergebnisse nicht mehr zu erheben waren.

- d) das Hyaluronidasepräparat "Kinetin" von der Firma Schering in der Konzentration von 150 IE/ml.
- e) Heparin in einem Lösungspräparat "Heparintoleranztest" von der Firma Roche.

Die Reagentien a bis d entsprechen also dem bei unserem Vorversuch verwendeten Material, ein Faktor, der uns möglichst genaue und exakte Vergleichsmöglichkeiten schaffen soll. Das Reagens e (Heparin) verwendeten wir in den Konzentrationen von 0,2 IE/ml

0,3 IE/ml

und 0,4 IE/ml,

also in Dosen, die einen deutlich gerinnungsverlängernden Effekt in vitro aufweisen. Die Lösungskonzentrationen stellten wir durch entsprechende Verdünnung der Stammlösung mit der oben angegebenen Pufferlösung her.

Im einzelnen gingen wir folgend vor:

Versuch I:

Der Versuch I gliedert sich in drei Versuchsanordnungen a, b und c, jede Anordnung besteht aus vier Versuchsreihen mit jeweils verschiedener Thrombinkonzentration 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8. Mit jeder der vier Thrombinkonzentrationen wurden zur Erlangung einer gewissen statistischen Sicherheit zwölf Einzelversuche durchgeführt. Aus den zwölf Ergebnissen wurden dann Mittelwerte errechnet.

Im Einzelversuch wärmten wir 0,2 ml Mischplasma 1 Minute lang im Wasserbad (auf 37°) vor.

Bei Versuchsanordnung a wurden dann 0,2 ml Pufferlösung und 0,1 ml Thrombin (in den oben angegebenen Konzentrationen) zugefügt. Wie bei der Bestimmung der Thrombinzeit wurde der ganze Versuch im Wasserbad bei einer Temperatur von 37° C. durchgeführt, die Reagentien wurden mittels einer Drahtöse verrührt. Die Zeit von der Thrombinzugabe bis zur Gerinnungsbildung an der Öse wurde mit der Stoppuhr ermittelt.

In Versuchsanordnung b ersetzten wir 0,2 ml von der Pufferlösung durch die gleiche Menge Heparin (0,3 IE/ml).

Bei Versuchsanordnung c schließlich wurde der restliche 0,1 ml Puffer durch 0,1 ml Hyaluronidase (150 IE/ml) ersetzt.

Die einzelnen Versuchsanordnungen sind folgend noch einmal schematisch dargestellt.

Ansatz zu Versuch I

Versuchsanordnung a

(Leerversuch)

Je Einzelversuch wurden verwendet:

- o,2 ml Normal-Mischplasma
- + o,2 ml Pufferlösung von pH 7,3
- + o,1 ml Thrombin (in abfallender Konzentration
1:1, 1:2, 1:4 und 1:8)

Versuchsanordnung b

(Heparinzugabe)

-
- o,2 ml Normal-Mischplasma
 - + o,1 ml Heparin (o,3 IE/ml)
 - + o,1 ml Pufferlösung von pH 7,3
 - + o,1 ml Thrombin (in abfallender Konzentration
1:1, 1:2, 1:4 und 1:8)

Versuchsanordnung c

(Zugabe von Heparin u.
Hyaluronidase)

-
- o,2 ml Normal-Mischplasma
 - + o,1 ml Heparin (o,3 IE/ml)
 - + o,1 ml Hyaluronidase (15o IE/ml)
 - + o,1 ml Thrombin (in abfallender Konzentration
1:1, 1:2, 1:4 und 1:8)

Mit jeder Thrombinkonzentration wurden 12 Einzelversuche durchgeführt, jede der drei Versuchsanordnungen enthält also 48 Einzelversuche. Die erzielten Ergebnisse sind in Tabelle I aufgeführt.

Tabelle I

Thrombinkonzentration in abfallender Reihe	1/1	1/2	1/4	1/8
a) LEERVERSUCH	14,7	18,9	25,0	37,6
b) HEPARINZUGABE	15,7	22,2	35,1	59,7
c) HEPARIN + HYALURONI- DASE	15,9	22,2	36,4	59,8

Die in Tabelle I angegebenen Werte stellen die Thrombinzeit in Sekunden dar und sind Mittelwerte aus jeweils 12 Einzelbestimmungen.

Ergebnis des Versuches I:

Die Mittelwerte des Versuches I sind in Tabelle I dargestellt.

Die Versuchsanordnungen a und b liefern uns Ausgangs- und Vergleichswerte. Die Ergebnisse der Versuchsreihe b dokumentieren die bekannte Verlängerung der Thrombinzeit nach Zugabe von Heparin. Die Ergebnisse der Versuchsreihe c zeigen, daß die Verlängerung der Thrombinzeit durch Inkubation von Hyaluronidase nicht signifikant beeinflußt wird, denn die Ergebnisse der Versuchsreihen b und c sind im wesentlichen kongruent.

Mit Hilfe der Thrombinzeit können wir also die hypothetische Blockierung der beiden Stoffe Heparin und Hyaluronidase nicht nachweisen.

In Versuch II haben wir daher versucht, an einem anderen Ansatzpunkt im Gerinnungsvorgang diese These zu überprüfen, und zwar mit Hilfe der Rekalzifizierungszeit,

Versuch II:

Überprüfung der Rekalzifizierungszeit am thrombozytenhaltigen Mischplasma:

- a) im Leerversuch
- b) nach Heparinzugabe
- c) nach Zugabe von Heparin und Hyaluronidase.

Der Einzelversuch wurde nach der üblichen Bestimmung der Rekalzifizierungszeit durchgeführt, es wurden dieselben Reagentien wie beim Vorversuch verwendet. Wir wärmten die einzelnen Substanzen zuvor auf 37° C. vor und führten die Experimente bei dieser Temperatur im Wasserbad durch.

Außerdem verwendeten wir die bei der Bestimmung der Rekalzifizierungszeit gebräuchliche Calciumchloridlösung von $1/40$ mol. Die Rekalzifizierungszeit wird mit der Stoppuhr vom Moment der CaCl_2 -Zugabe bei stetigem Umrühren bis zur Gerinnelsbildung an der Drahtöse gemessen.

Um eine möglichst breite Versuchsbasis zu erhalten, wendeten wir zusätzlich in Versuch II drei verschiedene Heparinkonzentrationen an:

0,2 IE/ml

0,3 IE/ml

und 0,4 IE/ml.

Die Versuchsanordnungen sind im folgenden noch einmal schematisch dargestellt.

Ansatz zu Versuch II

Versuchsanordnung a

(Leerversuch)

Je Einzelversuch wurden verwendet:

- 0,2 ml Normal-Mischplasma
- + 0,2 ml Pufferlösung von pH 7,3
- + 0,2 ml CaCl_2 mol/40

Versuchsanordnung b

(Heparinzugabe)

-
- 0,2 ml Normal-Mischplasma
 - + 0,1 ml Heparin in den Konzentrationen
 - 0,2 IE/ml
 - 0,3 IE/ml
 - und 0,4 IE/ml.
 - + 0,1 ml Pufferlösung von pH 7,3
 - + 0,1 ml CaCl_2 mol/40

Versuchsanordnung c

(Zugabe von Heparin
und Hyaluronidase)

-
- 0,2 ml Normal-Mischplasma
 - + 0,1 ml Heparin (0,2; 0,3; 0,4 IE/ml)
 - + 0,1 ml Hyaluronidase (150 IE/ml)
 - + 0,1 ml CaCl_2 mol/40

In jeder Versuchsanordnung wurden jeweils 8 Einzelversuche durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle II aufgeführt sind.

Tabelle II

Heparinkonzentrationen	0,2 IE/ml	0,3 IE/ml	0,4 IE/ml
a) LEERVERSUCH	94,6	107,9	56,1
b) HEPARINZUGABE	118,0	150,1	129,5
c) HEPARIN UND HYALURONIDASE	115,8	154,8	153,0

Die in Tabelle II angegebenen Werte stellen die Rekalzifizierungszeit in Sekunden dar und sind Mittelwerte aus 8 Einzelbestimmungen.

Ergebnis des Versuches II:

Vergleichen wir die Werte der Versuchsergebnisse (Tabelle II) so imponiert auch hier die bekannte Verlängerung der Rekalzifizierungszeit nach Heparinzugabe, und zwar ist die Beeinflussung der Rekalzifizierungszeit proportional der Heparinkonzentration. Setzen wir nun den verschiedenen Heparinkonzentrationen Hyaluronidase im Überschuß zu, so wird auch hier der gerinnungshemmende Effekt des Heparins nicht vermindert. Auch durch die Bestimmung der Rekalzifizierungszeit läßt sich also eine Beeinträchtigung der fermentativen Wirkung des Heparins durch die Hyaluronidase nicht nachweisen.

Versuch III:

Trotz größter Bemühungen, in den bisher dargestellten Versuchen möglichst exakte Werte zu erlangen, sind wir uns dessen bewußt, daß durch die relativ groben Methoden eine entsprechende Anzahl von Meßfehlern unvermeidbar war.

In der Anwendung des sogenannten Thrombelastographen (Firma Hellige) bietet sich uns dagegen die Möglichkeit, unsere bisherigen Versuchsergebnisse noch einmal mit einer wesentlich empfindlicheren Methode zu überprüfen. Das Prinzip des Thrombelastographen sei daher kurz skizziert.

Der Apparat besteht im wesentlichen aus drei Behältern, sogenannten Cuvetten, in welche das zu untersuchende Material eingebracht wird. In die gefüllten Cuvetten wird dann jeweils ein Schwingstift eingelassen, der an einem Faden frei aufgehängt ist und frei in dem zu untersuchenden Material schwebt.

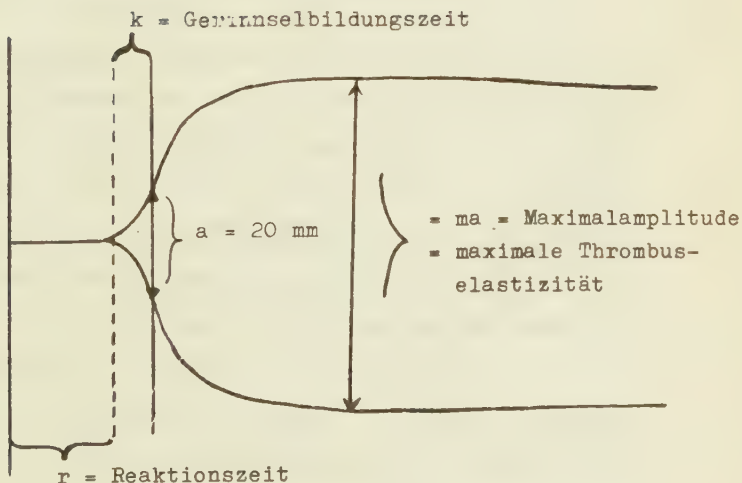
Kommt es dann in der zu prüfenden Flüssigkeit zur Gerinnselbildung, so wird das Gerinnsel den Schwingstift in feinste Ausschläge versetzen, welche ihrerseits über ein äußerst empfindliches Hebelsystem auf eine Skala und einen Kurvenschreiber projiziert werden.

Wie aus dem vorher Gesagten ersichtlich, läßt sich also aus der entstehenden Kurvenschreibung zunächst einmal die Zeit vom Versuchsbeginn bis zum Anfang der Gerinnselbildung messen, in dieser Zeit erfolgt also noch kein Ausschlag des Lichtzeigers.

Nach Hartert nennen wir diese Zeit die "Reaktionszeit". (Genauere Angaben s. Broschüre Nr.13 der Hel-
lige Nachrichten, 7. Auflage, Mai 1958). Die Reak-
tionszeit entspricht also beim Rekalzifizierungs-
versuch der Rekalzifizierungszeit.

Weiterhin läßt sich mit dem Thrombe-
lastographen die Gerinnselbildungszeit (nach Har-
tert = k) und durch Auswertung des weiteren Kurven-
verlaufes die Thrombuselastizität (= ma) messen.

Aus folgendem Schema sei die Normal-
kurve der Thrombelastographie und ihre Daten zu er-
sehen.



Entsprechend unseren bisher durchgeführten Versuchen interessiert hier nur die Reaktionszeit, da sich in ihrer Veränderung eine Einwirkung von Heparin oder Hyaluronidase auf die Rezalzifizierungszeit dokumentieren würde.

Versuchsanordnung III:

Bei unseren Untersuchungen mit dem Thrombelastographen wählten wir die gleichen Versuchsbedingungen und die gleichen Reagentien wie bei den bisher beschriebenen Versuchen. Ein im Thrombelastographen eingebauter Thermostat sorgte für die ständige Aufrechterhaltung einer Temperatur von 37° C.

Durch Auffüllen der Cuvetten mit Paraffinöl wurde das zu untersuchende Material unter völligen Luftabschluß gebracht.

Auf Grund der Ergebnisse des Vorversuches (2) wissen wir, daß die Hyaluronidaseinkubation von 150 IE/ml nur beim thrombozytenarmen Mischplasma zu einer signifikanten Verlängerung der Gerinnungszeit führt, während beim Normal-Mischplasma die Thrombokinasen zu sehr im Überschuß vorhanden zu sein scheint, um eine deutliche Verlängerung zu ergeben. Wir führten daher unsere Versuche mit dem Thrombelastographen mit thrombozytenarmem Mischplasma durch.

Die Anzahl der zum Plasma inkubierten Reagentien verlangt in einer Versuchsreihe 4 verschiedene Ansätze, im Thrombelastographen stehen uns je-

doch nur drei Cuvetten zur Verfügung, so daß in jedem Experiment auf eine der 4 Versuchsanordnungen verzichtet werden mußte (s. Tabelle III). Das Fassungsvermögen der einzelnen Cuvetten beträgt jeweils 0,36 ml. Für Experimente mit dem Thrombelastographen sind von der Herstellerfirma folgende Mengenverhältnisse als optimal angegeben worden:

0,3 ml Plasma

+ 0,06 ml einer 1,29 mg %igen CaCl_2 -Lösung.

Die Mengenverhältnisse der von uns angewendeten Reagentien sind weiter unten aus den schematischen Versuchsansätzen zu ersehen.

Der Versuch III gliedert sich in vier Ansätze, und zwar:

- a) Leerversuch
- b) alleinige Zugabe von Hyaluronidase
- c) alleinige Zugabe von Heparin
- d) Zugabe von Heparin und Hyaluronidase.

In Ansatz a setzten wir zu 0,22 ml thrombozytenarmen Mischplasma 0,08 ml Pufferlösung und 0,06 ml einer 1,29mg%igen CaCl_2 -Lösung.

In Ansatz b inkubierten wir zu 0,22 ml thrombozytenarmen Mischplasma 0,04 ml Pufferlösung und 0,04 ml Hyaluronidase (150 IE/ml) und 0,06 ml einer 1,29 mg%igen CaCl_2 -Lösung.

In Anordnung c wurden den übrigen in Anordnung b verwendeten Reagentien anstelle der Hyaluronidase 0,04 ml Heparin (0,3 IE/ml) zugefügt.

In Anordnung d inkubierten wir zu 0,22 ml thrombozytenarmen Mischplasma 0,04 ml Hyaluronidase (150 IE/ml) und 0,04 ml Heparin (0,3 IE/ml) sowie 0,06 ml einer 1,29 mg%igen CaCl_2 -Lösung.

Die Versuchsansätze zu Versuch III sind im Folgenden noch einmal schematisch dargestellt.

Ansatz zu Versuch III

Versuchsanordnung a

(Leerversuch)

Je Einzelversuch wurden verwendet:

- o,22 ml thrombozytenarmes Mischplasma
 - + o,08 ml Pufferlösung von pH 7,3
 - + o,06 ml CaCl_2 1,29 mg%
-

Versuchsanordnung b

(Heparinzugabe)

-
- o,22 ml thrombozytenarmes Mischplasma
 - + o,04 ml Pufferlösung von pH 7,3
 - + o,04 ml Heparin (0,3 IE/ml)
 - + o,06 ml CaCl_2 1,29 mg%
-

Versuchsanordnung c

(Zugabe von
Hyaluronidase)

-
- o,22 ml thrombozytenarmes Mischplasma
 - + o,04 ml Pufferlösung von pH 7,3
 - + o,04 ml Hyaluronidase (150 IE/ml)
 - + o,06 ml CaCl_2 1,29 mg%
-

Versuchsanordnung d

(Zugabe von Heparin
und Hyaluronidase)

-
- o,22 ml thrombozytenarmes Mischplasma
 - + o,04 ml Heparin (0,3 IE/ml)
 - + o,04 ml Hyaluronidase (150 IE/ml)
 - + o,06 ml CaCl_2 1,29 mg%
-

Die bei den vier Versuchsanordnungen a, b, c und d
erzielten Werte für r sind in der folgenden Tabelle
III aufgeführt.

Tabelle III R-WERTE

	LEERVERSUCH	ZUGABE VON HEPARIN	ZUGABE VON HYALURONIDASE	ZUGABE VON HEPARIN UND HYALURONIDASE
1)	11,5	14,0	14,0	
2)	10,5	14,0	13,5	
3)	8,5	13,5	13,0	
4)	8,5	11,0	10,5	
5)	8,0	9,5		13,5
6)	9,5	11,5		15,0
7)	6,0	8,5		16,0
8)	6,0	9,0		16,0
9)	5,5	9,0		11,0
10)	9,0	11,5		14,5
11)	10,0	12,0		16,5
12)	10,0		13,0	18,0
13)		12,0	9,0	15,0
14)		14,0	12,5	16,5
15)		15,5	14,5	20,5
16)		14,0	12,0	16,5
17)		14,5	12,5	17,5
18)		12,0	13,0	16,5
19)		16,0	15,5	20,0
20)		15,0	14,0	17,5
Mittel- werte	8,4	11,7	13,2	15,8

Die in Tabelle III angegebenen Werte stellen die r-Zeit (s. vorangegangene Erklärung) in Minuten dar und sind Einzelwerte. Insgesamt führten wir also 20 Einzelversuche durch. Die Ergebnisse der Ansätze, die in dem jeweiligen Versuch benutzt wurden, stehen in einer Reihe nebeneinander.

Versuchsergebnis:

Wie aus Tabelle III zu ersehen ist, führt die Inkubation von Hyaluronidase (150 IE/ml) zu thrombozytenarmem Mischplasma zu einer Verlängerung der Reaktionszeit (r) um etwa 3 bis 5 Minuten. Dieser Versuch bestätigt also unsere im Vorversuch erhaltenen Ergebnisse.

Die Zugabe von Heparin (0,3 IE/ml) zu thrombozytenarmem Mischplasma zeigt die bekannte Verlängerung der Gerinnungszeit, die in diesem Experiment in ihrem Ausmaß etwa der Hemmwirkung der Hyaluronidase entspricht.

Gleichzeitige Heparin-Hyaluronidase-Inkubation bewirkt augenscheinlich eine Addition der gerinnungshemmenden Wirkung beider Substanzen, die sie allein dem Plasma zugesetzt ausüben.

Eine gegenseitige Inaktivierung der beiden Stoffe Heparin und Hyaluronidase ist also aus den in Tabelle III aufgeführten Ergebnissen nicht zu ersehen.

Diskussion:

Ausgehend von Literaturberichten wurde mit gerinnungsphysiologischen Methoden untersucht, inwieweit sich die beiden Stoffe Heparin und Hyaluronidase im menschlichen Plasma gegenseitig beeinflussen und gegebenenfalls blockieren. In einem Vorversuch wurde der gerinnungsverzögernde Einfluß der Hyaluronidase bei Bestimmung der Thrombinzeit, der Thromboplastinzeit und der Rekalkifizierungszeit dargestellt, womit die Ergebnisse einer Großzahl anderer Autoren bestätigt wurden.

Da von beiden Substanzen, sowohl von der Hyaluronidase als auch vom Heparin, eine gerinnungsverzögernde Wirkung bekannt ist, untersuchten wir im Hauptversuch die Gerinnungsverzögerung bei gleichzeitiger Zugabe beider Stoffe, um eine eventuelle gegenseitige Blockierung durch eine dadurch bedingte quantitative Einschränkung der Gerinnungshemmung nachzuweisen.

Wir untersuchten daher nach Inkubation beider Stoffe die Rekalkifizierungszeit und die Thrombinzeit.

Der bekannte gerinnungsverzögernde Effekt des Heparins wurde durch die Zufuhr von Hyaluronidase nach unseren Ergebnissen nicht im geringsten eingeschränkt.

Mit den üblichen gerinnungsphysiologischen Methoden konnte also eine gegenseitige Inaktivierung beider Substrate nicht nachgewiesen werden.

Ergänzend wurde die Bestimmung der Rekalkifizierungszeit unter Anwendung des wesentlich exakter arbeitenden Thrombelastographen wiederholt, wobei

sich allerdings ebenfalls keine signifikante gegenseitige Inaktivierung von Heparin und Hyaluronidase nachweisen ließ. Gleichzeitige Heparin-Hyaluronidaseinkubation bewirkt augenscheinlich eine Addition der gerinnungshemmenden Wirkung beider Substanzen, die sie allein dem Plasma zugesetzt ausüben, die vorher erzielten Ergebnisse wurden somit bestätigt.

Die in der Literatur veröffentlichten und oben angegebenen Berichte über die hyaluronidasehemmende Aktivität des Heparins fußen auf Untersuchungsmethoden biochemischer Art. Die Autoren erzielten ihre Ergebnisse mit viscosimetrischen, turbidimetrischen Messungen und mit einer auf dem Spreadingeffekt beruhenden Farbstoff-Hyaluronidase-quaddelmethode. Außerdem findet sich im Gewebe bezüglich der Elektrolyte, des pH und der Eiweißkörper ein so völlig anderes Milieu als im Plasma, daß sich ein Vergleich zwischen den oben beschriebenen und unseren Methoden sowie ihrer Ergebnisse ausschließt.

Die in unseren Versuchen angewandten gerinnungsphysiologischen Methoden scheinen uns zum Nachweis einer gegenseitigen Beeinflussung der beiden Substanzen ungeeignet zu sein.

Der negative Ausfall unserer Experimente schließt also lediglich eine gegenseitige Blockierung von Hyaluronidase und Heparin bezüglich ihrer gerinnungshemmenden Eigenschaften weitgehend aus.

Zusammenfassung:

Ausgehend von Literaturberichten wird die Frage diskutiert, ob eine gegenseitige biochemische Beeinflussung von Heparin und Hyaluronidase stattfindet, und ob sich diese Beeinflussung mit gerinnungsphysiologischen Untersuchungen nachweisen läßt. Mit Hilfe der Bestimmungen von Thromboplastinzeit und Rexalzifizierungszeit wird in einem Vorversuch zunächst noch einmal der gerinnungsverzögernde Effekt der Hyaluronidase allein untersucht und bestätigt.

Im Hauptversuch werden diese gerinnungsphysiologischen Untersuchungen einschließlich der Thrombinzeit sowie einer Versuchsreihe mit dem Thrombelastographen unter Zugabe von Heparin durchgeführt. Alle diese Versuche lassen jedoch eine signifikante gegenseitige Beeinflussung beider Fermente bezüglich ihrer gerinnungsphysiologischen Eigenschaften nicht erkennen.

Herrn Privatdozent Dr. med. H. Mathies danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Auch Herrn Dr. med. A. Walcher bin ich für wertvolle Hinweise auf gerinnungsphysiologischem Gebiet und für seine Hilfe dankbar.

Herrn Professor Dr. med. W. Seitz bin ich für die Übernahme des Korreferates zu großem Dank verpflichtet.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Alburn, H.E. und R.W. Whitley
Federation Proceedings 13 (1954) 330
2. Baserga, A. und P. de Nicola
Experimentia 6 (1950) 471
3. Badin, J. und M. Schubert
J. clin. invest. 34 (1955) 1317
4. Berlepsch, K. von
Biochem. Zeitschrift 329 (1958) 542- 548
5. Blair Scott, G.W.
Biochem. Journal 56 (1954) 504
6. van Caneghem, P. und H.W. Spier
Biochem. Zeitschrift 325 (1954) 366
7. Mc. Clean, D.
Biochem. Journal 37 (1943) 169
8. Djerassi, I., Klein, E. und Faber, S.
Proceedings soc. exper. biol. med. 97 (1958)
481
9. Domenjoz, R.
Arch. exp. path. u. pharmacol. 225 (1955) 14
10. Ferrari, W., Costa, E. und P. Pellegrini
Arch. Sci. Biol. 33 (1949) 48
11. Fiala, S., Meranze, D.R. und K. Roth
Science 115 (1952) 600
12. Gaspari, A.
Boll. soc. ital. biol. sper. 29 (1953) 553
13. Gibian, H.
Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen
Franz Deuticke Verlag Wien
14. Glick, D., Edmondson, P.R. und R. Ottosen
J. of biol. Chemistry 233 (1958) 1241
15. Hadidian, Z. und N.W. Pirie
Biochem. Journal 42 (1948) 266

16. Houck, J.C.
Arch. of Biochem. and Biophysics 71 (1957) 336
17. Johnston, J.P.
Biochem. Journal 59 (1955) 626
18. Juhlin, L.
Acta pharmacologica 12 (1956) 321
19. Koller, F. und W. Fritschy
Helvetica Medica Acta 14 (1947) 263
20. Mayer, R.L.
Annals N.Y. Academy of Science 52 (1950) 1141
21. Mathies, H.
Arzneimittelforschung 8 (1958) 233
22. Mathies, H.
Zschr. ges. exp. Med. 131 (1959) 118
23. Mathies, H. und v. Werther, G.
Zschr. angew. Bäderklimak. 5 (1958) 503
24. Mathies, H.
Arch. phys. Ther. im Druck
25. Mathies, H.
Zschr. Rheumaforschung 18 (1959) 308
26. Mathies, H.
Arch. intern. Pharmacodyn. 123 (1960) 334
27. Mathies, H.
Med. exper. 1 (1959) 64
28. Pantschliko, M. und E. Kaiser
Biochem. Zeitschrift 322 (1951) 137
29. Pellegrini, P. und L. Russo
Bollettino soc. ital. biol.sper. 28 (1952) 165
30. Perlick, E.
Antikoagulantienfiebel
Georg Thieme Verlag Leipzig

31. Quattrin, N.
Il Farmaco 5 (1950) 505
32. Ramoino, L. und G.C. Minola
Rassegna ital. di chirurg. e med
2 (1953) 131
33. Rasmussen, P.S.
Acta chem. scandinavia 8 (1954) 633-636
34. Rogers, H.J.
Biochem. J. 42 (1948) 633
35. Sayers, G. und Sayers, M.
Endocrinology 40 (1947) 256
36. Schumacher, H.
Therapeutische Gegenwart 92 (1953) 167
37. Stepantschitz, G.
Wien. klin. Wschr. 66 (1954) 169
38. Swyer, G.I.M.
Biochem. Journal 42 (1948) 32
39. Werle, E. und F. Turtur
Biochem. Zeitschrift 319 (1948) 337
40. Winterstein, A.
Thrombose und Embolie
Hamburger Symposion April 1954
Thieme Verlag Stuttgart

Lebenslauf.

Als Tochter des Hoteliers Fritz Wess und seiner Ehefrau Elisabeth Wess wurde ich am 20.12.1937 in Essen geboren. Nach drei Jahren Grundschule - ein Jahr der Volksschulausbildung ging mir durch die Kriegsverhältnisse verloren - bestand ich 1948 die Aufnahmeprüfung des städtischen Gymnasiums in Gelsenkirchen-Buer. Hier legte ich 1957 die Reifeprüfung ab.

Nach einem Semester Medizinstudium in Freiburg und folgenden vier Semestern an der Universität in München bestand ich 1959 das Physikum an der medizinischen Fakultät in München.

Mein klinisches Studium begann ich mit zwei Semestern an der Universität Innsbruck. Die letzten vier Semester studierte ich wiederum an der Universität München, wo ich im Sommer 1963 das ärztliche Staatsexamen bestand.

